10 月 October
2019, 62(10): 1228 – 1238
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2019.10.011

克什米尔蜜蜂病毒(KBV)研究进展

王 帅[1], 蔺哲广[2], 陈功文[1], 邓 洁[1], 郑火青[1,*], 胡福良[1]

(1. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310058; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 克什米尔蜜蜂病毒(Kashmir bee virus, KBV)作为一种毒力较强的蜜蜂急性病毒,自 20 世纪 70 年代被分离鉴定以来,已发现其广泛侵染世界各地的东方蜜蜂 *Apis cerana* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera*。KBV 在蜂群内通过垂直和水平两种方式进行传播,且狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 在其中扮演着重要角色,这使得 KBV 的分布范围持续扩散。目前已报道的病毒宿主除蜜蜂外,其还可侵染熊蜂、胡蜂等多种野生授粉昆虫。同时,KBV 作为一种典型的双顺反子病毒科病毒,由于其在分子生物学上与同科的蜜蜂急性麻痹病毒(acute bee paralysis virus, ABPV)和以色列急性麻痹病毒(Israeli acute paralysis virus, IAPV)间的高相似性,对该病毒流行性的调查与检测、分类等研究的混乱局面也接踵而至。本文对过去 40 多年来的 KBV 相关研究进行综述,以期为 KBV 及类似昆虫病毒的后续研究提供一定的参考和借鉴,促进养蜂业的健康发展。

关键词: 克什米尔蜜蜂病毒; 蜜蜂; 狄斯瓦螨; 蜂群健康; 寄生虫-病原-寄主相互作用

中图分类号: Q965.8　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2019)10-1228-11

Advances in Kashmir bee virus (KBV)

WANG Shuai[1], LIN Zhe-Guang[2], CHEN Gong-Wen[1], DENG Jie[1], ZHENG Huo-Qing[1,*], HU Fu-Liang[1] (1. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: Kashmir bee virus (KBV), as an acute bee virus with high virulence, has been found to extensively infest *Apis cerana* and *Apis mellifera* around the world since it was isolated and identified in the 1970s. KBV spreads in honeybee colonies via both vertical and horizontal ways, and *Varroa destructor* plays an important role in this process, urging the continuous spreading of KBV's distribution. In addition to honeybees, KBV can also infect bumblebees, wasps and other wild pollinators. Meanwhile, as a typical virus of Dicistroviridae, due to the high similarity in the molecular biology between KBV and acute bee paralysis virus (ABPV) and Israeli acute paralysis virus (IAPV) in the same family, chaos related to its epidemic investigation, detection, classification and other research also come one after another. Here, we reviewed the relevant studies of KBV over the last forty years, aiming to provide insights for further studying KBV and similar insect virus and to facilitate the healthy development of beekeeping.

Key words: Kashmir bee virus; honeybees; *Varroa destructor*; colony health; parasite-pathogen-host interactions

蜜蜂作为自然界最主要的授粉昆虫之一,对世界粮食作物的安全、生物的多样性以及农业经济的发展等都具有重要作用(郑火青和胡福良, 2009; Genersch, 2010; vanEngelsdorp and Meixner, 2010;

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672498); 国家蜂产业技术体系专项(CARS-44)
作者简介: 王帅, 男, 1991 年 10 月生, 江苏宿迁人, 博士研究生, 研究方向为蜜蜂科学, E-mail: troywang0420@foxmail.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hqzheng@zju.edu.cn
收稿日期 Received: 2019-06-05; 接受日期 Accepted: 2019-08-05

Gill *et al*., 2012; Burkle *et al*., 2013; Garibaldi *et al*., 2016)。然而近年间,欧美诸国的西方蜜蜂 *Apis mellifera* 蜂群在越冬期间损失的现象愈发严重,发生的频率和死亡蜜蜂的数量也都有所上升(Faucon *et al*., 2002; Klein *et al*., 2007; vanEngelsdorp *et al*., 2008; Neumann and Carreck, 2010; Dietemann *et al*., 2012; Steinhauer *et al*., 2014; van der Zee *et al*., 2014; Jacques *et al*., 2017)。造成这种现象的原因众说纷纭,其中病毒及病毒与蜂螨间的协同作用被认为是导致蜜蜂死亡和蜂群崩溃的主要诱因之一(Allen *et al*., 1986; Korpela *et al*., 1992; Brødsgaard *et al*., 2000; Berthoud *et al*., 2010)。

蜜蜂病毒可以侵染蜂群中不同级型(蜂王、雄蜂和工蜂)和不同发育阶段(卵、幼虫、蛹和成蜂)的蜜蜂个体,同时可在蜂巢、蜜蜂食物(蜂蜜、蜂花粉、蜂王浆等)和蜂群寄生虫(瓦螨、小蜂螨和蜂箱小甲虫等)样本中检出(Sammataro *et al*., 2000; Boecking and Genersch, 2008; Dainat *et al*., 2009; Eyer *et al*., 2009),这显示了病毒在蜂群中的普遍性。目前,已有超过 30 种病毒被报道可以感染蜜蜂(Keven *et al*., 2006; Tantillo *et al*., 2015; Remnant *et al*., 2017),但其中只有少数蜜蜂病毒会在蜜蜂个体水平上表现出发病症状,如蜜蜂囊状幼虫病毒(sacbrood virus, SBV)和蜜蜂残翅病毒(deformed wing virus, DWV)。一般情况下,蜜蜂病毒常常以隐性感染的方式长期存在于蜂群中,而不表现出特异性病症(Hails *et al*., 2008)。类似于大多数蜜蜂病毒,克什米尔蜜蜂病毒(Kashmir bee virus, KBV)也被认为以隐性感染状态存在于蜂群内,直到一些应激(如营养不良)或者可替代宿主(如狄斯瓦螨 *Varroa destructor*)诱发其流行并进而成为急性致病病毒。KBV 被认为是所有蜜蜂病毒中致病性最强的病毒之一(Bailey and Ball, 1991; Allen and Ball, 1995),一旦被注入蜜蜂的血淋巴中,就会造成蜜蜂在短时间内死亡。有研究发现,当使用混合 KBV 病毒颗粒的食物饲喂蜜蜂时,这样并不会导致取食蜜蜂被感染,由此表明 KBV 并非经过消化道途径传播来危害蜜蜂,而很可能与"体壁 – 血淋巴"传播途径有关联(Bailey *et al*., 1979)。这就不难理解狄斯瓦螨与 KBV 之间的紧密联系(Bailey and Ball, 1991; Ribière *et al*., 2008)。狄斯瓦螨,俗称大蜂螨,作为蜜蜂的一种体外寄生虫(ectoparasite),主要靠吸食蜜蜂的体液生存,同时对蜜蜂个体的行为和健康也有直接影响(Ball, 1983; Ball and Allen, 1988; Delaplane and Hood, 1999; Martin, 2001; Todd *et al*., 2007)。已有研究证实,狄斯瓦螨可以在蜂群内携带和传播 KBV(Chen *et al*., 2004a; Shen *et al*., 2005a),并在狄斯瓦螨数量达到一定程度时引发蜜蜂致死的症状。因此,狄斯瓦螨与 KBV 疾病的流行与传播具有直接相关性(Todd *et al*., 2007)。

目前,虽然蜜蜂 KBV 的全基因组序列早已在 GenBank 上公布(de Miranda *et al*., 2004),但与其他昆虫病毒相比,包括 KBV 在内的蜜蜂病毒相关的研究相对滞后。由于缺乏相关数据,蜜蜂病毒病的流行与传播机制仍未得到充分揭示,且至今尚缺乏有效的预防和治疗手段。另外,国内除了十多年前姚军等介绍过包括 KBV 在内的蜜蜂病毒检测的研究进展(姚军等, 2003)外,国内以及国际上还没有关于此种病毒系统性的研究进展报道。在此,本文将从 KBV 的发现历史、分子生物学特征、发病与传播特点等方面进行系统性介绍,并就 KBV 对蜜蜂等寄主的危害和 KBV-狄斯瓦螨-蜜蜂三者间的关系以及 KBV 相关检测中的混乱现状等方面对当前的研究进行综述,以期为蜂群中 KBV 的正确检测以及对寄生虫-病原微生物-寄主间的互作关系研究提供一定的参考,并由此希望对 KBV 提供一个更加全面的认识。

1　KBV 的发现与分布

KBV 最初于 1977 年从饲喂了患病东方蜜蜂 *Apis cerana* 病毒液的西方蜜蜂体内被分离鉴定出来,因为这些东方蜜蜂来源于克什米尔地区,所以研究者就用此地名给这种病毒命名(Bailey and Woods, 1977)。但是,这并不能确定 KBV 的原始宿主。直到 Bailey 等(1979)再次在印度的东方蜜蜂上检测到 KBV 的存在,才初步确定 KBV 来源于东方蜜蜂。令人意想不到的是,随后在没有东方蜜蜂分布的澳大利亚,西方蜜蜂体内也检测出 KBV 的存在,并且是不同于东方蜜蜂来源的 KBV 新病毒株(Bailey *et al*., 1979; Hornitsky, 1987; Ellis and Munn, 2005)。Bailey 等(1979)曾提出 KBV 可能是澳大利亚和亚洲东南部地区蜜蜂的特有病毒类型,但是 Anderson 和 Gibbs(1988)在澳大利亚的本土无刺蜂上并没有检测到任何蜜蜂病毒,从而否定了这种说法。因为在澳洲各地陆续发现 KBV 的存在,这也引发了人们对于从澳洲大陆进口蜂群有可能造成 KBV 传播的担忧(Liu, 1991)。

目前，除了印度和澳大利亚（Bailey *et al.*, 1979; Hornitsky, 1987; Ellis and Munn, 2005）以外，KBV 在世界各地的西方蜜蜂群中陆续被报道，包括新西兰（Anderson, 1985）、加拿大（Anderson, 1985）、美国（Bruce *et al.*, 1995; Hung *et al.*, 1996a, 1996b）、斐济（Anderson, 1990）、西班牙（Allen and Ball, 1995）、法国（Tentcheva *et al.*, 2004; Siede *et al.*, 2005）、韩国（Yoo *et al.*, 2007）等地区。但是，人们对于中国境内 KBV 的传播与流行情况认识有限。虽然 Ai 等（2012）对中国境内两种蜜蜂的调查中没有发现 KBV 的存在，但是在基因文库中已有云南（GenBank 登录号：JX232598 – JX23260）、台湾（GenBank 登录号：GU108224）及中国未知地区（GenBank 登录号：KJ599574）等蜜蜂和浙江东方蜜蜂群内的狄斯瓦螨上的 KBV 序列（GenBank 登录号：MN114612 – MN114615）被公开（以上序列有待确认）。

2 双顺反子病毒科蜜蜂病毒的分类与分子生物学特征

在目前已知的 30 多种蜜蜂病毒中，除了蜜蜂丝状病毒（*Apis mellifera* filamentous virus, AmFV）和蜜蜂虹彩病毒（*Apis* iridescent virus, AIV）是 DNA 病毒外，其他均为正义单链 RNA 病毒：它们具有一个无被膜的直径大约 20 ~ 30 nm 的二十面体蛋白外壳，在氯化铯中的浮力密度介于 1.33 ~ 1.42 g/mL 之间，沉降系数通常为 100 ~ 190 S（Bailey, 1976）。这些 RNA 病毒在分类学上归为仿小核糖核酸病毒目（picorna-like viruses），其中 KBV、蜜蜂急性麻痹病毒（acute bee paralysis virus, ABPV）、黑蜂王台病毒（black queen cell virus, BQCV）和以色列急性麻痹病毒（Israeli acute paralysis virus, IAPV）归属于新确定的双顺反子病毒科（Dicistroviridae）（Mayo, 2002）。除具有特殊的形态特征而未被归类的蜜蜂慢性麻痹病毒（chronic bee paralysis virus, CBPV）外，其他的蜜蜂病毒颗粒在形态学上均难以通过电子显微镜（electron microscope）来区分。

双顺反子病毒科病毒具有一条正义单链 RNA，这可以直接作为病毒蛋白翻译的模板（mRNA）。典型的双顺反子病毒 RNA 基因具有两个不重叠的开放阅读框（open reading frames, ORFs），且在基因组两侧各有一个非翻译区（untranslated regions, UTRs）。基因组 5′端有一个小的基因组连接病毒蛋白（genome-linked virus protein, VPg），3′端连接一个特别的 Poly（A）尾巴，二者具有维持基因组的稳定及防止 RNA 分子降解的功能。两个 ORFs 之间的非翻译区被称为基因间隔区（intergenic region, IGR），其间夹杂着双顺反子病毒科病毒特有的高度保守的内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site, IRES）。基因组近 5′端和近 3′端的两个 ORFs 分别编码并合成非结构蛋白（non-structural protein）和衣壳蛋白（capsid protein）前体，然后进入位于 5′端 UTRs 和 IGR 内的 IRES 上进行 RNA 基因的翻译（de Miranda *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005a; Le Gall *et al.*, 2008; 张炫等, 2012）。

3 KBV 的致病特征与传播途径

3.1 感染 KBV 蜜蜂的发病特征

KBV 首先发现于成蜂体内，病毒粒子在进入成蜂血淋巴后几天内就会导致宿主死亡（Bailey *et al.*, 1979; Berényi *et al.*, 2006），因此它被认为是毒力最强的蜜蜂病毒之一（Bailey and Ball, 1991; Allen and Ball, 1995）。然而，被低剂量 KBV 所感染的蜜蜂通常并没有明显的发病症状（Dall, 1985; Anderson and Gibbs, 1988; Hung *et al.*, 1996a, 1996b; Shen *et al.*, 2005a），且有报道称感染低剂量 KBV 的蜜蜂（包括幼虫、蛹和成蜂）可以慢慢恢复健康（Hornitsky, 1981, 1982）。但是，在细胞和组织水平上，Dall（1987）通过电镜观察发现，KBV 在蜜蜂前肠和后肠上皮组织、消化道肌肉组织、表皮、气管上皮、血细胞、卵母细胞、气管末端细胞内进行了增殖，并且被感染的细胞表现出明显的病理反应。另有证据表明，KBV 可以侵染蜜蜂除了头部以外的其他组织（Chen *et al.*, 2006b），但在蜜蜂的神经系统组织中并未发现 KBV 扩增的证据（Dall, 1987）。

蜂群中同时存在多种病毒是一种普遍的现象（Anderson and Gibbs, 1988; Anderson, 1990; Hung *et al.*, 1996a, 1996b; Leat *et al.*, 2000; Evans, 2001; Tentcheva *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2008），且单头蜜蜂也会被多种病毒同时感染（Chen *et al.*, 2004b）。例如，KBV 会与其他病毒如 SBV（Dall, 1985; Shen *et al.*, 2005a）共同感染蜜蜂。而且，KBV 由于具有较强的快速扩增能力，通常在被多种病毒感染的蜜蜂体内居于主导地位（Anderson and Gibbs, 1988）。对于同属于双顺反子病毒科的几种蜜蜂病毒而言，它们同时感染蜜蜂也是比较常见的。

Anderson 和 Gibbs(1988)报道了 KBV 可以和 BQCV 及 SBV 等病毒共存，并且 KBV 的激活能够抑制 BQCV 和 SBV 的复制与扩增；随后，Evans(2001)又提供了 KBV 与 ABPV 同时感染单头蜜蜂的证据。ABPV, KBV 和 IAPV 这 3 种病毒在蜂群中有着广泛的流行率，特别是在蜂群同时感染狄斯瓦螨的时候，且这可能与蜂群损失关系密切(de Miranda *et al.*, 2010)。相比于其他蜜蜂病毒，KBV 似乎以较低的流行率与其他病毒共存于蜂群内的成蜂、幼虫或寄生蜜蜂的蜂螨体内，而蜂螨同时也扮演着病毒载体和病毒扩增的诱发因子的角色(Tentcheva *et al.*, 2004)。

3.2　KBV 的传播途径

KBV 与其他蜜蜂病毒一样通过垂直传播和水平传播两种途径在蜂群内扩散(Chen *et al.*, 2006a)。

3.2.1　垂直传播：通过精液传播病毒的途径早已经在哺乳动物中被证实(Dejucq and Jegou, 2001)。在蜜蜂上，Yue 等(2006)在雄蜂的精液中也检测到 DWV 和 ABPV 的存在，且 1 头蜂王最多可以和 28 头雄蜂交配(Kraus *et al.*, 2005)，故雄蜂通过精液垂直传播病毒的可能性不可忽视。Chen 等(2005)报道了在西方蜜蜂蜂王上存在较高的多重病毒感染率，其中 1 头蜂王有多达 5 种病毒同时侵染，并由此推测病毒在蜂群内存在垂直传播的途径。随后这种推测得到了证实：KBV 在蜂王和卵上均可检出(Chen *et al.*, 2006b)。

3.2.2　水平传播：研究发现，KBV 在各种蜜蜂食物来源(蜂蜜、蜂花粉、蜂王浆和幼虫食物)上也有存在(Shen *et al.*, 2005a)，且哺育蜂与幼虫间的接触也可以传播病毒(Lanzi *et al.*, 2006)；此外，KBV 在西方蜜蜂蜂王和工蜂的排泄物中同样被检测到，意味着其在蜂群内水平传播的可能(Hung, 2000; Chen *et al.*, 2006b)。而作为病毒的有效载体，蜂螨在蜜蜂病毒水平传播的过程中起到了重要作用，这其中又以狄斯瓦螨为甚。

3.3　狄斯瓦螨在 KBV 传播过程中的作用

狄斯瓦螨在世界范围的传播对于蜂群中的病毒感染水平具有显著的影响(Bakonyi *et al.*, 2002)，且能与蜜蜂病毒共同侵害蜂群，表现出复合症状(蔺哲广等, 2016)。狄斯瓦螨由于在蜜蜂幼虫与成蜂之间规律性地生活与移动，故该螨有作为蜜蜂病毒生物载体的潜在可能(Chen *et al.*, 2004a)。狄斯瓦螨在吸食蜜蜂体液的过程中很可能通过唾液传播 KBV(Shen *et al.*, 2005a)，同时 Shen 等(2005b)还发现未成熟和成熟狄斯瓦螨体内均具有很高的 KBV 感染水平，也间接证实这种可能。此外，狄斯瓦螨不仅直接传播病毒，它的寄生也会降低宿主的免疫反应和激活宿主体内可能长期潜伏的病毒，这更容易导致幼虫被其他的病毒感染(Shen *et al.*, 2005b; Yang and Cox-Foster, 2005)。

值得注意的是，已有充分的结果表明狄斯瓦螨是蜂群中一个很有效的病毒载体，例如狄斯瓦螨可使 DWV 在蜜蜂个体间相互传播(Bowen-Walker *et al.*, 1999; Martin, 2001)。Bakonyi 等(2002)也发现同时有 ABPV 和蜂螨存在时，蜂群更容易遭受严重的损失。所以，我们也就容易理解蜂螨在 KBV 传播中的特殊地位：狄斯瓦螨可以传播 KBV 给其寄主蜜蜂，而且在同一巢房寄生的狄斯瓦螨也会互相传播 KBV(Chen *et al.*, 2004a)。类似于蜂螨与 DWV 间的关系，这其中可能的传播途径是感染 KBV 的蜂螨传染病毒给蜜蜂幼虫，而未感染的蜂螨因为吸食幼虫体液被感染。

狄斯瓦螨的寄生不仅可以传播病毒(Ball, 1983)，而且较高的狄斯瓦螨寄生率也会导致蜂群中更高的病毒滴度(Francis *et al.*, 2013)。蜂螨与病毒的共同作用也被证实与蜂群的群势下降关系紧密(Cox-Foster *et al.*, 2007; Francis *et al.*, 2013)，因此，蜂群崩溃与病毒以及狄斯瓦螨间的联系不容忽视(Carreck *et al.*, 2010)。狄斯瓦螨促进蜜蜂病毒的增殖与扩散导致蜂群崩溃的现象早前已被描述为寄生螨综合症(parasitic mite syndrome) (Shimanuki *et al.*, 1994)。虽然寄生螨综合症与病毒间的联系还存在一定的争议(Hung *et al.*, 1996c)，但是狄斯瓦螨在蜜蜂病毒传播过程中的关键作用是毋庸置疑的。

4　KBV 的检测与寄主范围

4.1　KBV 检测方法的发展

得益于分子生物学的发展，病毒的检测手段也发生了变革，其中普通 PCR 检测被认为是克服蜜蜂病毒检测障碍的有效手段。对比于传统的物理学和血清学检测，自从 Stoltz 等(1995)开发出第一对蜜蜂病毒的普通 PCR 引物以来，KBV 的检测就变得方便经济很多。随后 Hung 和 Shimanuki(1999a)在此基础上进行了优化，并在美国的西方蜜蜂和首次在单头雅氏瓦螨 *Varroa jacobsoni* 上检测到 KBV 的存

在(Hung and Shimanuki, 1999b),并发现了新的 KBV 毒株品系(Hung *et al*., 2000)。同时,该方法灵敏度很高,比如,同一个样本使用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)的免疫学方法检测不到 KBV 的存在,而使用 PCR 检测却显示了低水平的 KBV 感染(Shen *et al*., 2005a)。因此,该引物一直被持续广泛地使用(Hung and Shimanuki, 1999a, 1999b; Evans, 2001; Chen *et al*., 2004a, 2004b; Tentcheva *et al*., 2004; Chen *et al*., 2005, 2006a, 2006b; Yue and Genersch, 2005; Antúnez *et al*., 2006; Yue *et al*., 2006; Baker and Schroeder, 2008)。近年来,TaqMan 探针法与 SYBR Green 荧光法进行 KBV 病毒定量 PCR 检测的手段也已开发利用(Chantawannakul *et al*., 2006; Cox-Foster *et al*., 2007),其灵敏度相比于传统的 PCR 方法高出约 1 000 倍(Mumford *et al*., 2000; Ward *et al*., 2004; Harju *et al*., 2005)。Chantawannakul 等(2006)就利用此种方法在泰国的单头蜂螨上检测到 5 种蜜蜂病毒的存在,意味着此种方法在蜂螨病毒检测上的可行性与灵敏性。

之前的研究显示,即使在同一个国家或地区内,不同的 KBV 毒株的蛋白表达谱和血清学亲和力之间也存在明显差异(Bailey *et al*., 1979; Allen and Ball, 1995; Stoltz *et al*., 1995)。基于这些方法和序列,Evans 和 Hung(2000)阐明了不同蜜蜂来源病毒间的差异序列和进化关系,并明确了美国与澳大利亚的 KBV 间非常接近的亲缘关系;Siede 和 Büchler(2004)以及 Todd 等(2007)也都发现新西兰与北美间 KBV 的进化关系相近,由此显示了北美与澳洲两地区之间的 KBV 毒株可能存在的亲缘关系。

4.2 寄主范围

当前关于 KBV 的地理分布和原始宿主的研究莫衷一是。尽管有研究认为 KBV 来源于亚洲东南部的东方蜜蜂,但是 KBV 已广泛存在于世界各地的西方蜜蜂(Allen and Ball, 1995; Tentcheva *et al*., 2004; Siede *et al*., 2005; Ward *et al*., 2007; Yoo *et al*., 2007; Antúnez *et al*., 2012; Cersini *et al*., 2013),印度、韩国、巴布亚新几内亚的东方蜜蜂(Bailey and Woods, 1977; Bailey *et al*., 1979; Allen and Ball, 1996; Choe *et al*., 2012),新西兰和比利时的熊蜂 *Bombus* spp. (Anderson, 1991; Meeus *et al*., 2014)以及澳大利亚和新西兰的胡蜂 *Vespula germanica* (Anderson, 1991; Ward *et al*., 2007; Dobelmann *et al*., 2017)。即使在某一个国家或地区(如法国),也很难对已知的蜜蜂病毒进行明显的地理归类(Tentcheva *et al*., 2004)。

美洲的非洲化蜜蜂(Africanized honey bee)也已发现被 KBV 侵染(Calderón *et al*., 2003)。但是,南美洲乌拉圭境内的西方蜜蜂群并未检测到 KBV 的存在(Antúnez *et al*., 2006)。与此同时,中欧的奥地利、匈牙利及其周边国家的蜂群中也未检测到 KBV (Berényi *et al*., 2006; Forgach *et al*., 2008; Berthoud *et al*., 2010),支持了 KBV 可能是外来病原的假设。而在国内,Ai 等(2012)对中国境内的东方蜜蜂和西方蜜蜂进行调查,结果均没有发现 KBV 的存在,但是发现了 ABPV 和 IAPV 等与其同科的蜜蜂病毒。不过西班牙之前没有检测到 KBV 的存在,但近些年却也有了 KBV 感染蜂群的报道(Antúnez *et al*., 2012),所以再加上基因文库中的数据(见前文),中国境内蜜蜂上也可能已经有 KBV 的存在(蔺哲广, 2017)。

因为 ABPV 和 KBV 具有很高的基因序列相似性,因此有学者推测这两种病毒可能来源于共同的祖先,后又形成各自独立的地理分支(de Miranda *et al*., 2004),而 ABPV 在世界范围内的分布以及 KBV 相对较窄的分布区域也支持了这种假设。随后作者又推测近期 KBV 在欧洲的出现可能是从海外引进的结果。

5 KBV 与 ABPV 和 IAPV 的关系

ABPV, KBV 和 IAPV 均属于典型的双顺反子病毒科病毒:一个单链正义 RNA 包含两个被基因间隔区(IGR)分开的开放阅读框(ORFs),两侧是非翻译区(UTRs)。在翻译过程中,碱基的替换可能被兼并(Baker and Schroeder, 2007),这样就不会对其编码的氨基酸组成造成影响,由此保持 ABPV, KBV 和 IAPV 的核心功能不变(Baker and Schroeder, 2008)。

5.1 蜜蜂急性麻痹病毒(ABPV)

ABPV 在 1963 年从一次 CBPV 的传染性试验中被分离发现(Bailey *et al*., 1963),随后 ABPV 在世界各地的西方蜜蜂蜂群中被报道(Allen and Ball, 1996; Benjeddou *et al*., 2001; Bakonyi *et al*., 2002; Antúnez *et al*., 2005; Ellis and Munn, 2005; Siede *et al*., 2008; Francis and Kryger, 2012; Ueira-Vieira *et al*., 2015)。研究发现,不同发育阶段的蜜蜂个体均可感染 ABPV,典型的症状是被 ABPV 感染的成年

工蜂身体颤抖且不能飞行，出现麻痹症状后 1～2 d 内即死亡。

ABPV 被认为是致使蜂群损失和崩溃的一个重要因子，特别是患病蜂群同时被狄斯瓦螨侵染时，危害更加严重(Allen *et al*., 1986; Bakonyi *et al*., 2002; Tentcheva *et al*., 2004; Chantawannakul *et al*., 2006; 张炫等, 2012)。蜂群内染病成年蜜蜂可能通过唾液传播 ABPV 给幼虫食物。当幼虫摄入一定量的病毒时，一些在封盖前就死亡；或者幼虫成功出房后，变成隐性感染的成年蜜蜂(Bailey and Ball, 1991)。

5.2　以色列急性麻痹病毒(IAPV)

IAPV 于 2007 年在以色列的西方蜜蜂上被分离鉴定(Maori *et al*., 2007)，并可以侵染蜂群中各发育时期(卵、幼虫、蛹和成蜂)和各级型(工蜂、雄蜂和蜂王)的蜜蜂个体。典型的发病症状为：患病蜜蜂体色变暗，绒毛脱落，伴随翅震颤，后逐渐地麻痹死亡。

对 IAPV 的广泛关注开始于 2007 年美国蜂群崩溃失调症(colony collapse disorder, CCD)暴发期间，Cox-Foster 等(2007)研究结果显示 IAPV 与 CCD 现象有很强的相关性。CCD 事件引发了世界范围对因蜜蜂数量持续减少而带来的农业授粉危机和生态危机的关注，随后 IAPV 在欧洲、亚洲和美洲的多个国家被报道(Maori *et al*., 2007; Chen and Evans, 2007; Palacios *et al*., 2008)，证实其自然条件下的广泛分布，并可能已经存在相当长的时间。

5.3　ABPV, KBV 和 IAPV 间的相似性

尽管 KBV 与 ABPV 在基因组层面上有超过 70% 的同源序列，但是它们在基因组的部分序列上差异明显，比如 5′端非翻译区、非结构多聚蛋白(non-structural polyprotein)以及结构多聚蛋白(structural polyprotein)上的一条 90 个氨基酸的序列。同时，进化分析也显示二者存在中等程度分化，并在聚类分析中呈现出明显差异(de Miranda *et al*., 2004)。

作为双顺反子病毒科的新成员，IAPV 的病症与 ABPV 相似，并且其生物学和系统发育学特性都与 ABPV 和 KBV 非常接近，但是在基因序列和血清学上又存在一定差异(de Miranda *et al*., 2010)。在双顺反子病毒科中，KBV 和 IAPV 拥有 96% 的核苷酸序列一致性，其次是 KBV 和 ABPV 之间(核苷酸序列一致性为 93%)，ABPV 和 IAPV 之间(核苷酸序列一致性为 92%)。另外，KBV 和 IAPV 在氨基酸序列上也有高达 96% 的一致性(Baker and Schroeder, 2008)。正是因为这 3 种病毒间相近的关系，King 等(2011)提出将它们归类为新的蜜蜂麻痹病毒属 *Aparavirus* 的建议。

与 DWV 相近的病毒，如狄斯瓦螨病毒Ⅰ型(*Varroa destructor* virus Ⅰ, VDV1)，也被称作 B 型 DWV(Mordecai *et al*., 2016)。同样地，有学者也认为 IAPV 可能是 KBV 的一个变种或者亚型(Baker and Schroeder, 2008; de Miranda *et al*., 2010)。另有学者建议最好将 ABPV, KBV 和 IAPV 3 种相似的蜜蜂病毒当作一个复合体(Acute-Kashmir-Israeli complex, AKI)来检测与分析，后续利用测序确定具体的病毒种类(Maori *et al*., 2007; de Miranda *et al*., 2010; Francis and Kryger, 2012; Francis *et al*., 2013)。所以，在评估这 3 种病毒对蜂群健康危害的时候，需要去认真考虑它们间的相关性及其可能带来的影响。

5.4　KBV 检测的混乱现状

在 IAPV 被确定以来，其与 KBV 的关系就一直纠缠不清。尽管 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)经常被用来进行蜂群中病毒的调查和不同病毒间的分类(Tentcheva *et al*., 2004; Chen *et al*., 2005; Shen *et al*., 2005a)，但是已经有充分的证据表明在基于 RdRp 基因进行引物设计时要更加谨慎(Baker and Schroeder, 2008)。值得注意的是，已经有研究证实传统的 KBV 引物(Stoltz *et al*., 1995)的特异性不强，可能同时会扩增出 IAPV 的片段，这也是法国第一次发现 IAPV 的由来(Blanchard *et al*., 2008)。

基于二者在多个方面的高相似，一些 KBV 检测的结果值得去推敲。例如，Yoo 等(2007)报道的韩国 KBV 序列显示与 IAPV 序列有 97% 的核苷酸序列一致性，在氨基酸水平更是高达 99% 的序列一致性，而与其他 KBV 序列比较时，这个值分别介于 88% ～ 98% 和 97% ～ 99% 之间；Al-Abbadi 等(2010)同时检测了约旦蜂群中的 KBV 和 IAPV，结果显示二者拥有相近的侵染率(分别为 12% 与 13%)，在检测到 IAPV 的 6 个地区中有 5 个地区也同时检测到 KBV 的存在，并且测序分析也显示 IAPV 与 KBV 最为相似。事实上，像韩国(GenBank 登录号：EU770972)、俄罗斯(GenBank 登录号：AF197905 – AF197908)、约旦(Al-Abbadi *et al*., 2010)以及澳大利亚的一个序列(GenBank 登录号：AF034541)等已经被证实为 IAPV，而非此前认为的

KBV(de Miranda *et al*., 2010)。此外,Blanchard 等(2014)采用新的 PCR 引物和方法对法国境内的西方蜜蜂重新进行病毒筛查,结果只有一个蜜蜂样本呈现 KBV 阳性,这与之前的结果大相径庭(Tentcheva *et al*., 2004);最终分析显示,之前的 KBV 属于 IAPV,而这才是第一次在法国检测到 KBV。

综上可见,我们确实应该重新审视之前的 KBV 检测结果。除了当需要与基因文库中的数据作比较时,de Miranda 等(2010)甚至建议弃用之前 Stolz 等(1995)设计的引物。一个有效的解决途径是利用多重引物来检测这些病毒(Evans and Hung, 2000; Bakonyi *et al*., 2002; Siede *et al*., 2005),但是费时费力且不经济。目前也有了一些尝试,Francis 和 Kryger(2012)开发出 AKI 引物(AKI-F: 5′-CTTTCATGATGTGGAAACTCC-3′; AKI-R: 5′-AAACTGAATAATACTGTGCGTA-3′),可以单一检测到其中 1 种或者也可以同时检测存在 2 种或 3 种病毒的情况;另一个最简单经济的方法是严格根据基因上的保守序列以及不同病毒间的序列差异仔细进行特异性引物的设计(de Miranda *et al*., 2010),如 Blanchard 等(2014)就开发了用于单独检测 KBV 的新 PCR 扩增引物(KBV-F2952: 5′-TATGCTGAACAACGCAAAGA-3′; KBV-R3610: 5′-ACAACACGATGTCTGGGTTT-3′),获得的产物大小为 659 bp。

6 小结与展望

蜂群健康问题是国际上普遍关注的热点话题之一,寄生虫、病原体以及蜜蜂间的关系也越来越吸引各国学者的注意。KBV 自发现以来就开始在世界范围内传播流行,并对蜜蜂及其他昆虫健康造成危害。随着国际上蜜蜂相关贸易的增加,这对蜜蜂病原微生物的全球传播起到推波助澜的作用。同时,狄斯瓦螨作为病毒与蜜蜂间的连接纽带,对包括 KBV 在内的病毒在蜜蜂个体与蜂群内的流行以及病毒病的暴发等具有重要的影响。狄斯瓦螨不仅自身对蜜蜂健康产生危害,其与其他病原体的协同作用更降低了蜂群的健康态势(蔺哲广等, 2016)。作为同一科的病毒,KBV 与 ABPV 和 IAPV 间的相似性导致其在世界范围内的真实分布、在蜜蜂上的检测以及病毒种类的鉴定分类等方面目前仍处于一个比较混乱的局面。这 3 种病毒均具有较高的变异性(de Miranda *et al*., 2010),这也对有效且长期地研究和防治这 3 种病毒造成了一定的困难。

关于 KBV 等蜜蜂病毒,还需要各国科学家共同努力去深入研究。而且,KBV 与 ABPV 和 IAPV 的病毒复合体研究也可以为其他同源性较高的病毒提供新的借鉴与研究思路。同时,关于昆虫上相关类似病毒间的检测也应该更加小心谨慎。当前,我们的主要任务是采取必要的防范措施控制蜂螨在蜂群内的流行,同时借鉴国际上先进的检测技术并结合我国养蜂业的实际进行蜜蜂病毒的检测与防控,以期在 KBV 还没有大量暴发之前,防患于未然。

参考文献(References)

Ai H, Yan X, Han R, 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *J. Invertebr. Pathol*., 109(1): 160–164.

Al-Abbadi AA, Hassawi DS, Abu-Mallouh SA, Al-Mazra′awi MS, 2010. Novel detection of Israel acute paralysis virus and Kashmir bee virus from honeybees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) of Jordan using reverse transcriptase PCR technique. *Appl. Entomol. Zool*., 45(1): 183–190.

Allen MF, Ball BV, 1995. Characterisation and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. *Ann. Appl. Biol*., 126(3): 471–484.

Allen MF, Ball BV, 1996. The incidence and world distribution of the honey bee viruses. *Bee World*, 77(3): 141–162.

Allen MF, Ball BV, White RF, Antoniw JF, 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *J. Apic. Res*., 25(2): 100–105.

Anderson DL, 1985. Viruses of New Zealand honey bees. *N. Z. Beek*., 188: 8–10.

Anderson DL, 1990. Pests and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. *J. Apic. Res*., 29(1): 53–59.

Anderson DL, 1991. Kashmir bee virus – a relatively harmless virus of honey bee colonies. *Am. Bee J*., 131(12): 767–770.

Anderson DL, Gibbs AJ, 1988. Inapparent virus infections and their interactions in pupae of the honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *J. Gen. Virol*., 69(7): 1617–1625.

Antúnez K, Anido M, Garrido-Bailón E, Botías C, Zunino P, Martínez-Salvador A, Martín-Hernández R, Higes M, 2012. Low prevalence of honeybee viruses in Spain during 2006 and 2007. *Res. Vet. Sci*., 93(3): 1441–1445.

Antúnez K, D′Alessandro B, Corbella E, Ramallo G, Zunino P, 2006. Honeybee viruses in Uruguay. *J. Invertebr. Pathol*., 93(1): 67–70.

Antúnez K, D′Alessandro B, Corbella E, Zunino P, 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *J. Invertebr. Pathol*., 90(1): 69–72.

Bailey L, 1976. Viruses attacking the honey bee. *Adv. Virus Res*., 20: 271–304.

Bailey L, Ball BV, 1991. Honey Bee Pathology. 2nd ed. Academic

Press, London.

Bailey L, Carpenter JM, Woods RD, 1979. Egypt bee virus and Australian isolates of Kashmir bee virus. *J. Gen. Virol.*, 43(3): 641-647.

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 21(3): 390-395.

Bailey L, Woods RD, 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee paralysis viruses. *J. Gen. Virol.*, 37(1): 175-182.

Baker AC, Schroeder DC, 2007. Occurrence and genetic analysis of picorna-like viruses infecting worker bees of *Apis mellifera* L. populations in Devon, South West England. *J. Invertebr. Pathol.*, 98(2): 239-242.

Baker AC, Schroeder DC, 2008. The use of RNA-dependent RNA polymerase for the taxonomic assignment of picorna-like viruses (order Picornavirales) infecting *Apis mellifera* L. populations. *Virol. J.*, 5(10): 1-10.

Bakonyi T, Farkas R, Szendroi A, Dobos-Kovács M, Rusvai M, 2002. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*, 33(1): 63-74.

Ball BV, 1983. The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees. *Exp. Appl. Acarol.*, 19: 607-613.

Ball BV, Allen MF, 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. *Ann. Appl. Biol.*, 113(2): 237-244.

Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S, 2001. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5): 2384-2387.

Berényi O, Bakonyi T, Derakhshifar I, Koglberger H, Nowotny N, 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Mircrobiol.*, 72(4): 2414-2420.

Berthoud H, Imdorf A, Haueter M, Radloff S, Neumann P, 2010. Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.*, 49(1): 60-65.

Blanchard P, Carletto J, Siede R, Schurr F, Thiéry R, Ribière M, 2014. Identification of Kashmir bee virus in France using a new RT-PCR method which distinguishes closely related viruses. *J. Virol. Methods*, 198: 82-85.

Blanchard P, Schurr F, Celle O, Cougoule N, Drajnudel P, Thiéry R, Faucon JP, Ribière M, 2008. First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in France, a dicistrovirus affecting honeybees (*Apis mellifera*). *J. Invertebr. Pathol.*, 99(3): 348-350.

Boecking O, Genersch E, 2008. Varroosis - the ongoing crisis in bee keeping. *J. Verbrauch. Lebensm.*, 3(2): 221-228.

Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A, 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *J. Invertebr. Pathol.*, 73(1): 101-106.

Brødsgaard CJ, Ritter W, Hansen H, Brødsgaard HF, 2000. Interactions among *Varroa jacobsoni* mites, acute paralysis virus, and *Paenibacillus larvae larvae* and their influence on mortality of larval honeybees in vitro. *Apidologie*, 31(4): 543-554.

Bruce WA, Anderson DL, Calderone NW, Shimanuki H, 1995. A survey for Kashmir bee virus in honey bee colonies in the United States. *Am. Bee J.*, 135(5): 352-355.

Burkle LA, Marlin JC, Knight TM, 2013. Plant-pollinator interactions over 120 years: loss of species, co-occurrence, and function. *Science*, 339(6127): 1611-1615.

Calderón RA, van Veen J, Arce HG, Esquivel ME, 2003. Presence of deformed wing virus and Kashmir bee virus in Africanized honey bee colonies in Costa Rica infested with *Varroa destructor*. *Bee World*, 84(3): 112-116.

Carreck NL, Ball BV, Martin SJ, 2010. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.*, 49(1): 93-94.

Cersini A, Bellucci V, Lucci S, Mutinelli F, Granato A, Porrini C, Felicioli A, Formato G, 2013. First isolation of Kashmir bee virus (KBV) in Italy. *J. Apic. Res.*, 52(2): 54-55.

Chantawannakul P, Ward L, Boonham N, Brown M, 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in *Varroa* mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. *J. Invertebr. Pathol.*, 91(1): 69-73.

Chen YP, Evans J, Feldlaufer M, 2006a. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 92(3): 152-159.

Chen YP, Evans JD, 2007. Historical presence of Israeli acute paralysis virus in the United States. *Am. Bee J.*, 147(12): 1027-1028.

Chen YP, Pettis JS, Collins A, Feldlaufer MF, 2006b. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl. Environ. Mircrobiol.*, 72(1): 606-611.

Chen YP, Pettis JS, Evans JD, Kramer M, Feldlaufer MF, 2004a. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 35(4): 441-448.

Chen YP, Pettis JS, Feldlaufer MF, 2005. Detection of multiple viruses in queens of the honey bee *Apis mellifera* L. *J. Invertebr. Pathol.*, 90(2): 118-121.

Chen YP, Zhao Y, Hammond J, Hsu H, Evans J, Feldlaufer M, 2004b. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 87(2-3): 84-93.

Choe SE, Nguyen LTK, Noh JH, Koh HB, Jean YH, Kweon CH, Kang SW, 2012. Prevalence and distribution of six bee viruses in Korean *Apis cerana* populations. *J. Invertebr. Pathol.*, 109(3): 330-333.

Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI, 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318(5848): 283-287.

Dainat B, Ken T, Berthoud H, Neumann P, 2009. The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* (Acari, Laelapidae) as a vector of

honeybee viruses. *Insect. Soc.*, 56(1): 40-43.

Dall DJ, 1985. Inapparent infection of honey bee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *Ann. Appl. Biol.*, 106(3): 461-468.

Dall DJ, 1987. Multiplication of Kashmir bee virus in pupae of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.*, 49(3): 279-290.

de Miranda JR, Cordoni G, Budge G, 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.*, 103: S30-S47.

de Miranda JR, Drebot M, Tyler S, Shen M, Cameron CE, Stoltz DB, Camazine SM, 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *J. Gen. Virol.*, 85(8): 2263-2270.

Dejucq N, Jegou B, 2001. Viruses in mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65(2): 208-231.

Delaplane KS, Hood WM, 1999. Economic threshold for *Varroa jacobsoni* Oud. in the southeastern USA. *Apidologie*, 30(5): 383-395.

Dietemann V, Pflugfelder J, Anderson DL, Charrière JD, Chejanovsky N, Dainat B, de Miranda J, Delaplane K, Dillier FX, Fuch S, Gallmann P, Gauthier L, Imdorf A, Koeniger N, Kralj J, Meikle W, Pettis J, Rosenkranz P, Sammataro D, Smith D, Yañez O, Neumann P, 2012. *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *J. Apicult. Res.*, 51(1): 125-132.

Dobelmann J, Loope KJ, Wilson-Rankin E, Quinn O, Baty JW, Gruber MA, Lester PJ, 2017. Fitness in invasive social wasps: the role of variation in viral load, immune response and paternity in predicting nest size and reproductive output. *Oikos*, 126(8): 1208-1218.

Ellis JD, Munn PA, 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86(4): 88-101.

Evans JD, 2001. Genetic evidence for coinfection of honey bees by acute bee paralysis and Kashmir bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 78(4): 189-193.

Evans JD, Huang ACF, 2000. Molecular phylogenetics and the classification of honey bee viruses. *Arch. Virol.*, 145(10): 2015-2026.

Eyer M, Chen YP, Schafer MO, Pettis J, Neumann P, 2009. Small hive beetle, *Aethina tumida*, as a potential biological vector of honeybee viruses. *Apidologie*, 40(4): 419-428.

Faucon JP, Mathieu L, Ribiere M, Martel AC, Drajnudel P, Zeggane S, Aurieres C, Aubert MFA, 2002. Honey bee winter mortality in France in 1999 and 2000. *Bee World*, 83(1): 14-23.

Forgacha P, Bakonyi T, Tapaszti Z, Nowotny N, Rusvai M, 2008. Prevalence of pathogenic bee viruses in Hungarian apiaries: situation before joining the European Union. *J. Invertebr. Pathol.*, 98(2): 235-238.

Francis RM, Kryger P, 2012. Single assay detection Acute bee paralysis virus, Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus. *J. Apic. Sci.*, 56(1): 137-146.

Francis RM, Nielsen SL, Kryger P, 2013. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 8(3): e57540.

Garibaldi LA, Carvalheiro LG, Vaissière BE, Gemmill-Herren B, Hipólito J, Freitas BM, Ngo HT, Azzu N, Sáez A, Åström J, An J, Blochtein B, Buchori D, Chamorro García FJ, Oliveira da Silva F, Devkota K, Ribeiro Mde F, Freitas L, Gaglianone MC, Goss M, Irshad M, Kasina M, Pacheco Filho AJ, Kiill LH, Kwapong P, Parra GN, Pires C, Pires V, Rawal RS, Rizali A, Saraiva AM, Veldtman R, Viana BF, Witter S, Zhang H, 2016. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. *Science*, 351(6271): 388-391.

Genersch E, 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87(1): 87-97.

Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422): 105-108.

Hails RS, Ball BV, Genersch E, 2008. Infection strategies of insect viruses. In: Aubert M, Ball B, Fries I, Moritz R, Milani N, Bernardinelli I eds. Virology and the Honey Bee. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 255-276.

Harju VA, Skelton A, Clover GRG, Ratti C, Boonham N, Henry CM, Mumford RA, 2005. The use of real-time RT-PCR (TaqMan®) and post-ELISA virus release for the detection of Beet necrotic yellow vein virus types containing RNA5 and its comparison with conventional RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 123(1): 73-80.

Hornitsky MAZ, 1981. The examination of honey bee virus in New South Wales. *Australas. Beekeeper*, 82: 261-262.

Hornitsky MAZ, 1982. Bee disease research. *Australas. Beekeeper*, 84: 7-10.

Hornitsky MAZ, 1987. Prevalence of virus infections of honeybees in eastern Australia. *J. Apic. Res.*, 26(3): 181-185.

Hung ACF, 2000. PCR detection of Kashmir bee virus in honey bee excreta. *J. Apic. Res.*, 39(3-4): 103-106.

Hung ACF, Ball BV, Adams JR, Shimanuki H, Knox DA, 1996a. A scientific note on the detection of American strains of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in dead bees in one US honey bee (*Apis mellifera* L.) colony. *Apidologie*, 27(1): 55-56.

Hung ACF, Peng CYS, Shimanuki H, 2000. Nucleotide sequence variations in Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 31(1): 17-23.

Hung ACF, Shimanuki H, 1999a. A scientific note on the detection of Kashmir bee virus in individual honeybees and *Varroa jacobsoni* mites. *Apidologie*, 30(4): 353-354.

Hung ACF, Shimanuki H, 1999b. A scientific note on the partial nucleotide sequence of a US strain of Kashmir bee virus isolated from *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 30(4): 355-356.

Hung ACF, Shimanuki H, Knox DA, 1996b. Inapparent infection of acute paralysis virus and Kashmir bee virus in the U.S. honey bees. *Am. Bee J.*, 136(12): 874-876.

Hung ACF, Shimanuki H, Knox DA, 1996c. The role of viruses in bee parasitic mite syndrome. *Am. Bee J.*, 136(10): 731-732.

Jacques A, Laurent M, EPILOBEE Consortium, Ribière-Chabert M, Saussac M, Bougeard S, Budge GE, Hendrikx P, Chauzat MP,

2017. A pan-European epidemiological study reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLoS ONE*, 12(3): e0172591.

Kevan PG, Hannan MA, Ostiguy N, Guzman-Novoa E, 2006. A summary of the Varroa-virus disease complex in honey bees. *Am. Bee J.*, 146(8): 694-697.

King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, 2011. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego.

Klein AM, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B*, 274(1608): 303-313.

Korpela S, Aarhus A, Fries I, Hansen H, 1992. *Varroa jacobsoni* Oud. in cold climates: population growth, winter mortality and influence on the survival of honey bee colonies. *J. Apic. Res.*, 31(3-4): 157-164.

Kraus FB, Neumann P, Moritz RFA, 2005. Genetic variance of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insect. Soc.*, 52(1): 1-5.

Lanzi G, de Miranda JR, Boniotti MB, Cameron CE, Lavazza A, Capucci L, Camazine SM, Rossi C, 2006. Molecular and biological characterization of deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera* L.). *J. Virol.*, 80(10): 4998-5009.

Le Gall O, Christian P, Fauquet CM, King AMQ, Knowles NJ, Nakashima N, Stanway G, Gorbalenya AE, 2008. *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Arch. Virol.*, 153(4): 715-727.

Leat N, Ball B, Govan V, Davison S, 2000. Analysis of the complete genome sequence of black queen cell virus, a picorna-like virus of honey bees. *J. Gen. Virol.*, 81(8): 2111-2119.

Lin ZG, 2017. Comparison between *Apis cerana* and *Apis mellifera* in the Host-Parasite Interactions with *Varroa destructor*. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [蔺哲广, 2017. 东方蜜蜂和西方蜜蜂与狄斯瓦螨间寄主-寄生虫互作关系的对比研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Lin ZG, Qin Y, Li L, Wang S, Zheng HQ, Hu FL, 2016. Synergistic effects of *Varroa destructor* and *Deformed wing virus* on honey bee health. *Acta Entomol. Sin.*, 59(7): 775-784. [蔺哲广, 秦瑶, 李利, 王帅, 郑火青, 胡福良, 2016. 狄斯瓦螨和蜜蜂残翅病毒对蜜蜂健康的协同影响. 昆虫学报, 59(7): 775-784]

Liu TP, 1991. Virus diseases of honey bees. *Am. Bee J.*, 131(6): 359.

Maori E, Lavi S, Mozes-Koch R, Gantman Y, Peretz Y, Edelbaum O, Tanne E, Sela I, 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.*, 88(12): 3428-3438.

Martin SJ, 2001. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: a modelling approach. *J. Appl. Ecol.*, 38(5): 1082-1093.

Mayo MA, 2002. Virus taxonomy - Houston 2002. *Arch. Virol.*, 147(5): 1071-1076.

Meeus I, de Miranda JR, de Graaf DC, Wäckers F, Smagghe G, 2014. Effect of oral infection with Kashmir bee virus and Israeli acute paralysis virus on bumblebee (*Bombus terrestris*) reproductive success. *J. Invertebr. Pathol.*, 121: 64-69.

Mordecai GJ, Wilfert L, Martin SJ, Jones IM, Schroeder DC, 2016. Diversity in a honey bee pathogen: first report of a third master variant of the Deformed Wing Virus quasispecies. *ISME J.*, 10(5): 1264-1273.

Mumford RA, Walsh K, Barker I, Boonham N, 2000. Detection of *Potato mop top virus* and *Tobacco rattle virus* using multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 90(5): 448-453.

Neumann P, Carreck NL, 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.*, 49(1): 1-6.

Nielsen SL, Nicolaisen M, Kryger P, 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie*, 39(3): 310-314.

Palacios G, Hui J, Quan PL, Kalkstein A, Honkavuori KS, Bussetti AV, Conlan S, Evans J, Chen YP, vanEngelsdorp D, Efrat H, Pettis J, Cox-Foster D, Holmes EC, Briese T, Lipkin WI, 2008. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J. Virol.*, 82(13): 6209-6217.

Remnant EJ, Shi M, Buchmann G, Blacquière T, Holmes EC, Beekman M, Ashe A, 2017. A diverse range of novel RNA viruses in geographically distinct honey bee populations. *J. Virol.*, 91(16): e00158-17.

Ribière M, Ball BV, Aubert MFA, 2008. Natural history and geographic distribution of honey bee viruses. In: Aubert M, Ball B, Fries I, Morritz R, Milani N, Bernardinelli I eds. Virology and the Honey Bee. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 15-84.

Sammataro D, Gerson U, Needham G, 2000. Parasitic mites of honey bees: life history, implications, and impact. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 519-548.

Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D, 2005a. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.*, 86(8): 2281-2289.

Shen M, Yang X, Cox-Foster D, Cui L, 2005b. The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, 342(1): 141-149.

Shimanuki H, Calderone NW, Knox DA, 1994. Parasitic mite syndrome: the symptoms. *Am. Bee J.*, 134(12): 827-828.

Siede R, Büchler R, 2004. First detection of Kashmir bee virus in Hesse, Germany. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 117(1-2): 12-15.

Siede R, Derakhshifar I, Otten C, Berényi O, Bakonyi T, Köglberger H, Büchler R, 2005. Prevalence of Kashmir bee virus in central Europe. *J. Apic. Res.*, 44(3): 129.

Siede R, König M, Büchler R, Failing K, Thiel HJ, 2008. A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. *Apidologie*, 39(6): 650 – 661.

Steinhauer NA, Rennich K, Wilson ME, Caron DM, Lengerich EJ, Pettis JS, Rose R, Skinner JA, Tarpy DR, Wilkes JT, vanEngelsdorp D, 2014. A national survey of managed honey bee 2012 – 2013 annual colony losses in the USA: results from the Bee Informed Partnership. *J. Apicult. Res.*, 53(1): 1 – 18.

Stoltz D, Shen XR, Boggis C, Sisson G, 1995. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. Apic. Res.*, 34(3): 153 – 160.

Tantillo G, Bottaro M, Di Pinto A, Martella V, Di Pinto P, Terio V, 2015. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. *Italian J. Food Saf.*, 4(3): 5364.

Tentcheva D, Gauthier L, Zappulla N, Dainat B, Cousserans F, Colin ME, Bergoin M, 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(12): 7185 – 7191.

Todd JH, de Miranda JR, Ball BV, 2007. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie*, 38(4): 354 – 367.

Ueira-Vieira C, Almeida LO, de Almeida FC, Amaral IMR, Brandeburgo MAM, Bonetti AM, 2015. Scientific note on the first molecular detection of the acute bee paralysis virus in Brazilian stingless bees. *Apidologie*, 46(5): 628 – 630.

van der Zee R, Brodschneider R, Brusbardis V, Charriére JD, Chlebo R, Coffey MF, Dahle B, Drazic MM, Kauko L, Kretavicius J, Kristiansen P, Mutinelli F, Otten C, Peterson M, Raudmets A, Santrac V, Seppälä A, Soroker V, Topolska G, Vejsnæs F, Gray A, 2014. Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012 – 2013: analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. *J. Apicult. Res.*, 53(1): 19 – 34.

vanEngelsdorp D, Hayes JJr, Underwood RM, Pettis J, 2008. A survey of honey bee colony losses in the U. S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS ONE*, 3(12): e4071.

vanEngelsdorp D, Meixner MD, 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.*, 103: S80-S95.

Ward L, Beales P, Barnes A, Lane C, 2004. A real-time PCR assay based method for routine diagnosis of *Spongospora subterranea* on potato tubers. *J. Phytopathol.*, 152(11 – 12): 633 – 638.

Ward L, Waite R, Boonham N, Fisher T, Pescod K, Thompson H, Chantawannakul P, Brown M, 2007. First detection of Kashmir bee virus in the UK using real-time PCR. *Apidologie*, 38(2): 181 – 190.

Yang X, Cox-Foster DL, 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(21): 7470 – 7475.

Yao J, Zhou T, Wang Q, 2003. Advances in detection of Kashmir bee virus and other viruses. In: 9th Academic Conference Album of Apicultural Science Association of China, Bee Protection Committee, Beihai, Guangxi, September 8 – 9, 2003. [姚军, 周婷, 王强, 2003. 蜜蜂克什米尔病毒及其他病毒病检测的研究进展. 见: 中国养蜂学会蜜蜂保护专业委员会第九次学术研讨会专辑, 广西北海, 2003 年 9 月 8 – 9 日]

Yoo MS, Kim EH, Kang MH, Han SH, Kwon SH, Yoon BS, 2007. Detection of Kashmir bee virus (KBV) from honeybees in Korean apiaries and investigation on molecular biology. *Korean J. Apic.*, 22(1): 33 – 42.

Yue C, Genersch E, 2005. RT-PCR analysis of *Deformed wing virus* in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.*, 86(12): 3419 – 3424.

Yue C, Schröder M, Bienefeld K, Genersch E, 2006. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): evidence for vertical transmission of viruses through drones. *J. Invertebr. Pathol.*, 92(2): 105 – 108.

Zhang X, Chen YP, He SY, 2012. A review of bee virology progress. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 49(5): 1095 – 1116. [张炫, 陈彦平, 和绍禹, 2012. 蜜蜂病毒学研究进展. 应用昆虫学报, 49(5): 1095 – 1116]

Zheng HQ, Hu FL, 2009. Honeybee: a newly emerged model organism. *Acta Entomol. Sin.*, 52(2): 210 – 215. [郑火青, 胡福良, 2009. 蜜蜂——新兴的模式生物. 昆虫学报, 52(2): 210 – 215]

(责任编辑: 赵利辉)